

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
26 avril 2001 (26.04.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/28650 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷: **B01D 11/02**
- (21) Numéro de la demande internationale: **PCT/FR00/02931**
- (22) Date de dépôt international: **20 octobre 2000 (20.10.2000)**
- (25) Langue de dépôt: **français**
- (26) Langue de publication: **français**
- (30) Données relatives à la priorité:
99/13138 21 octobre 1999 (21.10.1999) FR
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): **LABORATOIRES LAVIPHARM S.A. [FR/FR]**; 23, avenue de Neuilly, F-75116 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): **DESCHAMPS, Frantz [FR/FR]**; 13 rue Gandon, Escalier 3 - Etage 2, F-75013 Paris (FR). **MAJEWSKI, Wieslaw [FR/FR]**; 4 Immeuble Méridien, Terrasse Vosges, F-54520 Laxou (FR). **PERRUT, Michel [FR/FR]**; 25 rue Santifontaine, F-54000 Nancy (FR). **LAIMAY, François [FR/FR]**; 39bis Bd. Joffre, F-77300 Fontainebleau (FR).
- (74) Mandataire: **BREESE-MAJEROWICZ**; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).
- (81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— *Avec rapport de recherche internationale.*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: **METHOD FOR FRACTIONATING A RAW MATERIAL CONSISTING OF SEVERAL CONSTITUENTS USING A SUPERCRITICAL PRESSURE SOLVENT**

(54) Titre: **PROCEDE DE FRACTIONNEMENT D'UNE MATIERE COMPOSEE DE PLUSIEURS CONSTITUANTS A L'AIDE D'UN SOLVANT A PRESSION SUPERCRITIQUE**

WO 01/28650 A1

(57) Abstract: The invention concerns a method for fractionating a synthetic or natural material consisting of several constituents and containing at least an amphiphilic constituent. The invention is characterised in that said fractionating is carried out by means of a supercritical pressure solvent by dispersion of said material inside an insoluble or hardly soluble liquid in the supercritical pressure solvent. The inventive method is advantageously carried out for a mixture of lipids such as, for example an oil extracted from a cereal.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un procédé de fractionnement d'une matière naturelle ou synthétique composée de plusieurs constituants et contenant au moins un composant à caractère amphiphile, caractérisé en ce que ledit fractionnement est réalisé à l'aide d'un solvant à pression supercritique à partir d'une dispersion de ladite matière au sein d'un liquide insoluble ou très faiblement soluble dans le solvant à pression supercritique. Avantageusement le procédé de l'invention est mis en oeuvre sur un mélange de lipides comme par exemple une huile extraite de céréale.

PROCEDE DE FRACTIONNEMENT D'UNE MATIERE COMPOSEE
DE PLUSIEURS CONSTITUANTS A L'AIDE D'UN SOLVANT A PRESSION
SUPERCRITIQUE

5 La présente invention concerne un procédé de fractionnement d'une matière première composée de plusieurs constituants à l'aide d'un solvant à pression supercritique. On entend par solvant à pression supercritique selon l'invention, un solvant en état supercritique ou un liquide subcritique. Plus particulièrement l'invention se rapporte à 10 un procédé de fractionnement d'un mélange de lipides afin d'obtenir des fractions riches en certains lipides polaires appartenant aux classes des sphingolipides dont les céramides, des glycolipides et des phospholipides.

15 Un solvant en état supercritique est caractérisé soit par une pression et une température respectivement supérieures à la pression et à la température critiques dans le cas d'un corps pur, soit par un point représentatif (pression, température) situé au-delà de l'enveloppe des points critiques représentés sur un diagramme (pression, température) dans le cas d'un mélange. On sait qu'un solvant en état supercritique présente, pour de très nombreuses substances, un pouvoir solvant élevé sans commune mesure avec celui observé dans ce même solvant à l'état de gaz comprimé. Il en est de même des liquides dits "subcritiques". Des liquides subcritiques sont dans un état caractérisé soit par une pression supérieure à la pression critique et par une température inférieure à la température critique dans le cas d'un corps pur, soit par une pression supérieure aux pressions critiques et une température inférieure aux températures critiques des composants dans le cas d'un mélange (Michel PERRUT, les Techniques de l'Ingénieur, Extraction par fluide supercritique, J 2, 770, 20 30 35 1 à 12, 1999). Les variations importantes et modulables du pouvoir solvant de ces fluides sont d'ailleurs utilisées dans de nombreux procédés d'extraction (solide/fluide), de fractionnement (liquide/fluide), de chromatographie analytique ou préparative, de traitement des matériaux

(céramiques, polymères, etc...). Des réactions chimiques ou biochimiques sont également réalisées dans de tels solvants. Il est à noter que les propriétés physico-chimiques du dioxyde de carbone ainsi que ses coordonnées critiques (pression critique : 7,4 MPa et température critique : 31°C) en font le solvant préféré dans de nombreuses applications, surtout qu'il ne présente pas de toxicité et est disponible à très bas prix en très grande quantité. Solvant non polaire, le dioxyde de carbone, porté à pression supercritique est parfois additionné d'un co-solvant consistant en un solvant organique polaire qui va modifier le pouvoir solvant de façon notable surtout vis-à-vis de molécules présentant une certaine polarité, l'éthanol étant souvent utilisé à cette fin.

Il faut rappeler que les corps sont généralement connus sous trois états : solide, liquide et gazeux. On passe de l'un à l'autre en faisant varier la température et/ou la pression. Or il existe un point au-delà duquel on peut passer de l'état liquide à l'état gaz ou vapeur sans passer par une ébullition ou à l'inverse par une condensation, mais de façon continue, ce point est appelé le point critique.

L'un des avantages principaux des procédés mettant en œuvre les solvants à pression supercritique réside dans la facilité de réaliser la séparation entre le solvant (le fluide) et les extraits et solutés, ainsi qu'il a été décrit dans de nombreuses publications, comme par exemple dans le brevet français publié sous le No. 2 584 618. Les propriétés intéressantes de ces fluides sont d'ailleurs utilisées depuis longtemps en extraction solide-fluide et fractionnement liquide-fluide, ainsi qu'il est décrit dans l'article cité ci-dessus.

Le procédé de l'invention est tout particulièrement adapté au fractionnement de matière première naturelle ou synthétique composée de plusieurs constituants, et contenant au moins un composant à caractère amphiphile, dont on souhaite extraire un ou plusieurs constituants sous forme purifiée. Ce but est atteint grâce à

un procédé de fractionnement d'une matière première naturelle ou synthétique composée de plusieurs constituants et contenant au moins un composant à caractère amphiphile, caractérisé en ce que ledit fractionnement est réalisée à l'aide d'un solvant à pression supercritique à partir d'une dispersion de ladite matière première au sein d'un liquide insoluble ou très faiblement soluble dans le solvant à pression supercritique.

Des matières premières préférées auxquelles le procédé de l'invention est tout particulièrement adapté sont celles dont l'un au moins des constituants est, à l'état purifié, semi-liquide, pâteux ou même solide, et dont le caractère visqueux empêche de les traiter en colonne.

Le composant amphiphile peut être ajouté à la matière première de départ à fractionner ou être l'un des constituants de celle-ci comme dans le cas d'une matière première constitué d'un mélange de lipides.

On entend par dispersion tant une émulsion qu'une suspension de la matière au sein d'un liquide insoluble ou très faiblement soluble dans le solvant à pression supercritique.

Le procédé de l'invention est donc particulièrement avantageux pour fractionner, extraire ou isoler un ou plusieurs constituants de la matière première de départ. Il consiste plus particulièrement à effectuer les étapes suivantes :

a) on prépare une dispersion à base de ladite matière première au sein d'un liquide insoluble ou très faiblement soluble dans le solvant à pression supercritique.

b) on soumet ladite dispersion à une extraction à l'aide d'un solvant à pression supercritique,

c) on recueille après ladite extraction deux fractions dont l'une est enrichie en l'un au moins d'un des constituants de la matière première,

d) éventuellement, on répète l'extraction sur l'une au moins des fractions recueillies à l'extraction précédente un nombre de fois suffisant pour obtenir l'un des constituants de la matière première sensiblement purifié dans une fraction.

Après la première extraction du procédé de l'invention, on recueille un raffinat et un extrait et l'on préfère notamment dans le cas d'une matière première constituée d'une mélange de lipide, effectuer les extractions suivantes sur le raffinat obtenu à l'extraction précédente.

Le procédé de l'invention s'intéresse plus particulièrement au fractionnement de lipides d'origine naturelle en vue d'obtenir à l'état purifiés différents composés polaires ou neutres.

Les lipides polaires sont connus pour présenter des propriétés physicochimiques particulièrement bien adaptées pour la préparation de dispersion dans l'eau, dans un solvant organique ou dans un mélange d'eau et de phase(s) organique(s), entrant dans la composition de produits cosmétiques, dermatologiques ou pharmaceutiques. En effet, ces lipides polaires sont des tensio-actifs remarquables pour stabiliser des interfaces eau-huile, et ils entrent en jeu dans la constitution des membranes des cellules vivantes. A ce jour, il est extrêmement difficile d'obtenir la plupart des lipides polaires à l'état pur à une échelle permettant des applications industrielles. Ainsi, à quelques exceptions près, ces produits ne sont disponibles que comme réactifs de laboratoire à des prix élevés. Par contre, des mélanges riches en lipides polaires sont disponibles à très grande échelle, telles les lécithines largement employées dans l'industrie alimentaire et en diététique. Il apparaît donc intéressant de fractionner ces mélanges en vue d'obtenir certains de leurs composants à l'état purifiés en vue de les utiliser dans des applications à haute valeur ajoutée car leurs propriétés premières exceptionnelles comme leur sécurité notamment virale, du fait de leur origine végétale, sont difficiles à trouver dans d'autres classes de produits même synthétiques.

Les lipides neutres sont aussi utiles dans le domaine cosmétique, mais également, comme les lipides polaires, dans le domaine agro-alimentaire. Ainsi, le procédé de l'invention est tout particulièrement intéressant

pour le dégommage des huiles alimentaires qui vise à éliminer les lipides polaires de l'huile. En effet, les lipides polaires sont susceptibles de limiter les propriétés organoleptiques et techniques de ces huiles.

5 En conséquence, le procédé de l'invention concerne plus particulièrement une matière première comprenant principalement un mélange de lipides, comme notamment une huile extraite de céréale par exemple de blé, de gluten de blé, d'orge, d'avoine, de millet, de riz, etc....

10 Tout particulièrement, le procédé de l'invention consiste à fractionner le mélange de lipides en fonction de la polarité des constituants. Ainsi, le procédé de l'invention permet d'obtenir, à l'issue d'une ou plusieurs extractions, une ou plusieurs fractions très riches en certains lipides polaires appartenant aux différentes classes suivantes : les sphingolipides, dont les céramides et les cérabrosides, les glycolipides, dont les monogalactosyldiglycérides et les digalactosyldiglycérides, les phospholipides et parmi ceux-ci notamment les 15 phosphatidyl-cholines, les phosphatidyl-éthanolamines, les phospholipides acides, et leurs dérivés.

20 Avantageusement, la dispersion est réalisée dans de l'eau ou dans une solution aqueuse de solvants organiques solubles dans l'eau, tels les alcools et de préférence l'éthanol, les cétones et de préférence l'acétone, les 25 esters et de préférence l'acétate d'éthyle.

30 Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé de l'invention, on utilise comme solvant à pression supercritique pour l'une au moins des extractions, le dioxyde de carbone pur ou en mélange avec différents co-solvants choisis parmi les hydrocarbures légers comprenant entre 2 et 8 atomes de carbone, les alcools et de préférence l'éthanol, les cétones et de préférence l'acétone, les 35 esters et de préférence l'acétate d'éthyle, les hydrocarbures halogénés et de préférence les hydrocarbures fluorés. Avantageusement, l'une au moins des extractions est alors réalisée avec du dioxyde de carbone pur ou en mélange avec un ou plusieurs des co-solvants cités ci-dessus, à une

pression comprise entre 7,4 et 50 MPa et de préférence entre 10 et 40 MPa et à une température comprise entre 0 et 80°C.

Selon un autre mode de mise en œuvre préféré du procédé de l'invention, on utilise comme solvant à pression supercritique pour l'une au moins des extractions, un hydrocarbure ayant entre 2 et 5 atomes de carbone, et de préférence 3 ou 4 atomes de carbone. En effet, dans le cas du fractionnement d'un mélange de lipides, ce second type de solvant s'avère particulièrement performant dans la première phase de séparation des lipides neutres et des lipides polaires. En conséquence, la première extraction de l'étape (b) est alors avantageusement réalisée avec un hydrocarbure ayant entre 2 et 5 atomes de carbone, et favorablement 3 ou 4 atomes de carbone, à une pression comprise entre 4,2 et 20 MPa, et plus favorablement entre 5 et 15 MPa et à une température comprise entre 0 et 80°C.

Le procédé de l'invention peut être mis en œuvre en utilisant un système de fractionnement en discontinu par charges successives ou en continu sur colonne et dans ce dernier cas avantageusement sur une colonne fonctionnant à contre-courant. Un procédé de fractionnement sur colonne fonctionnant à contre-courant est aussi appelé dans l'art antérieur "fractionnement fluide-liquide ou liquide-liquide à contre-courant". La mise en œuvre et les applications du fractionnement à contre-courant sont largement décrites dans l'art antérieur (G. BRUNNER "Gas Extraction" chapitre 8, paru en 1994, Ed. Springer, ISBN 0-387-91477-3), notamment dans le cas des lipides (Supercritical Fluid technology in Oil and Lipid Chemistry, 1996, édité par J.W. KING et G.R. LIST, ISBN 0-935315-71-3). Il est utile de rappeler que les lipides, solubles dans les solvants organiques et insolubles dans les solvants aqueux, présentent des solubilités différentes dans les solvants à pression supercritique selon la polarité des molécules concernées et la nature des solvants mis en œuvre. Ainsi, le dioxyde de carbone pur est utilisé comme solvant des triglycérides et permet d'extraire les huiles de différentes sources naturelles comme les graines oléagineuses (brevets Britanniques No. 1 356 749 et

No. 1,356,750 ; brevet US 3 939 281). Il est également connu que ce solvant n'extrait pas les lipides polaires comme les lécithines présents dans ces mêmes graines. Cette sélectivité est d'ailleurs utilisée lors de l'extraction des 5 lipides du jaune d'œuf au sein duquel il est préférable de ne pas extraire les phospholipides dont les propriétés tensio-actives contribuent favorablement à la qualité organoleptique des aliments incorporant ce jaune d'œuf délipidé, en pâtisserie en particulier. Il est également 10 connu qu'on peut obtenir une lécithine totalement débarrassée de lipides neutres à partir d'huiles d'origine végétale extraites par la méthode classique à l'hexane. Néanmoins, les opérations de fractionnement de lipides à 15 l'aide de solvants à pression supercritique se heurtent souvent à de sérieuses difficultés de mise en œuvre car les phases initiales ou résultantes sont souvent très pâteuses, ce qui rend le contact avec le fluide solvant difficile voire impossible à réaliser. Certains dispositifs ont été 20 décrits pour traiter ce problème, comme par exemple un système d'extracteur à jet proposé par Eggers E. et Wagner H., ("Proceedings of the Third International Symposium on Supercritical Fluids", ISBN 2-905267-23-8, 1994, Tome 2, p.125-130) pour déshuiler une lécithine de soja. Toutefois, 25 il apparaît que ce système correspond à un étage théorique et ne peut valablement être mis en œuvre que pour réaliser des séparations pour lesquelles le facteur de séparation est élevé. Par contre, on ne peut réaliser ainsi un fractionnement de composés très voisins requérant un nombre élevé de plateaux théoriques généralement mis en œuvre sur 30 des colonnes multiétagées à plateaux perforés ou garnissage fonctionnant à contre-courant, équipements non utilisables avec des produits de très haute viscosité, comme certains mélanges de lipides, ou susceptibles de cristalliser ou de 35 se solidifier entraînant le bouchage des colonnes.

Dans le cas du fractionnement d'un mélange de lipides, on préfère donc tout particulièrement réaliser l'extraction à l'aide d'un solvant à pression supercritique sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait de façon à ce que la fraction obtenue en tête de

colonne après séparation du solvant, appelée généralement extrait, soit considérablement enrichie en lipides les moins polaires par rapport à la matière première de départ. La fraction recueillie en pied de colonne, appelée généralement raffinat, se présente sous la forme d'une dispersion dans un liquide et est considérablement enrichie en lipides les plus polaires. Le seuil de coupure de cet enrichissement est déterminé par les conditions opératoires. Par exemple, un premier traitement d'un mélange de lipides neutres et polaires selon ce mode de mise en œuvre permet d'obtenir en tête de colonne un extrait considérablement enrichi en lipides neutres et un raffinat considérablement enrichi en lipides polaires. Cette première étape est couramment nommée déshuileage. Dans le cas de raffinage de lécithines brutes, elle permet d'accéder à un raffinat qui se présente sous la forme d'une dispersion de lipides polaires. Ce premier raffinat peut directement être traité selon le même procédé avec des conditions opératoires qui définissent un seuil de fractionnement plus élevé en termes de polarité. Ainsi, le traitement de ce premier raffinat selon les étapes (b) et (c) du procédé objet de la présente invention permet d'obtenir un extrait enrichi en lipides polaires les moins polaires et un nouveau raffinat enrichi en lipides polaires les plus polaires. Ce deuxième raffinat se présente sous la forme d'une dispersion de lipides polaires et peut être à son tour traité selon les étapes (b) et (c) du procédé de l'invention avec de nouvelles conditions opératoires définissant un seuil de coupure supérieur à celui du traitement précédent en terme de polarité.

Cet enchaînement de traitement consistant à répéter les étapes (b) et (c) peut s'effectuer directement sur chaque nouveau raffinat de façon à aboutir à un fractionnement fin de la matière première.

Un exemple d'un tel procédé selon l'invention consiste à réaliser les étapes (b) et (c) sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, avec un solvant à pression supercritique constitué de dioxyde de carbone en mélange avec de l'éthanol à une concentration comprise entre 1 et 5% masse, porté à une pression comprise

entre 7,4 et 50 MPa, et de préférence entre 15 et 30 MPa, à une température comprise entre 32 et 80°C, de façon à ce que le fractionnement d'une charge ne contenant plus de lipides neutres conduise à une fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, qui est très enrichie en sphingolipides, dont les céramides et les cérébrosides, et en monogalactosyl diglycérides par rapport à la charge. Puis on réalise à nouveau les étapes (b) et (c) sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, avec un solvant à pression supercritique constitué de dioxyde de carbone en mélange avec de l'éthanol à une concentration comprise entre 3 et 8% masse, à une pression comprise entre 7,4 et 50 MPa, et de préférence entre 12 et 30 MPa, à une température comprise entre 32 et 80°C, de façon à ce que le fractionnement d'une charge constitué par le raffinat obtenu précédemment conduise à une fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, qui est très enrichie en digalactosyldiglycérides par rapport à la charge.

Une autre méthode de fractionnement des lipides a été récemment décrite dans le brevet américain US No. 5 759 549, consistant à adsorber le mélange à fractionner sur un solide poreux d'où les différents composants sont extraits successivement par un solvant à pression supercritique dont le pouvoir solvant et la polarité sont successivement augmentés. Ce procédé, dont le concept a été utilisé depuis plusieurs années par plusieurs auteurs, est connu sous le nom d'"extrographie", désignant la combinaison d'extraction et de chromatographie. Ce procédé peut être opéré avec une haute sélectivité, par combinaison de la sélectivité du solide adsorbant et de celle du solvant à pression supercritique, mais requiert des moyens complexes et ne peut être mis en œuvre qu'en mode discontinu par charges successives, ce qui induit des frais opératoires très élevés.

Un autre mode de mise en œuvre du procédé de l'invention sur un mélange de lipide consiste donc à réaliser le fractionnement en continu dans un contacteur

constitué d'un récipient sous pression éventuellement doté d'un garnissage destiné à améliorer la qualité du contact entre les deux phases du mélange à fractionner mis initialement en émulsion à l'étape (a), avec un solvant à 5 pression supercritique dont le pouvoir solvant va être modifié en plusieurs étapes successives de manière à extraire successivement les différentes familles de lipides par ordre croissant de polarité. Cette opération est rendue possible par le fait que les lipides non encore extraits ne 10 précipitent pas sous une forme de pâte qui serait observée si on traitait le mélange initial comme tel, mais restent en dispersion dans une phase liquide au sein de laquelle on peut faire percoler le fluide solvant dans de bonnes conditions pour le transfert de matière entre phases. De 15 plus, à la fin de l'opération, on peut vidanger le contacteur sans problème puisque le raffinat se présente sous forme d'une phase liquide de faible viscosité.

20 Dans une forme de mise en œuvre particulièrement avantageuse, le procédé de fractionnement est réalisé en continu. Le procédé de l'invention en continu, appliqué sur un mélange de lipides, comprend les étapes suivantes :

25 - on prépare une émulsion à base du mélange de lipides à fractionner dans de l'eau;
- on traite l'émulsion sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, opérée avec du dioxyde de carbone pur ou additionné d'un co-solvant à pression supercritique dans des conditions de pression et de température telles que la fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, appelée généralement 30 extrait, est considérablement enrichie en lipides neutres, tels les triglycérides et les stérols, et appauvrie en composés polaires qui sont quasiment en totalité récupérés en pied de colonne dans la fraction appelée raffinat se présentant comme une dispersion dans l'eau, ou un mélange 35 eau-cosolvant;

- le raffinat est fractionné sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, opérée avec du dioxyde de carbone, additionné d'un co-solvant

polaire, à pression supercritique comme solvant dans des conditions de pression et de température telles que la fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, est considérablement enrichie en composés les moins polaires, tels les sphingolipides, dont les céramides, et les monogalactosyldiglycérides (MGDG), et appauvrie en composés les plus polaires, tels les glycosphingolipides et les digalactosyldiglycérides (DGDG) et les phospholipides, qui sont tous récupérés en pied de colonne sous forme d'une dispersion dans une solution aqueuse du co-solvant polaire utilisé;

- le raffinat, obtenu lors de l'étape précédente, est fractionné sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, opérée avec du dioxyde de carbone, additionné d'un co-solvant polaire, choisi avantageusement identique à celui utilisé dans l'étape précédente, à pression supercritique comme solvant dans des conditions de pression et de température telles que la fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, est considérablement enrichie en composés moyennement polaires, tels les digalactosyldiglycérides (DGDG), et appauvrie en composés les plus polaires, tels les phospholipides, qui sont tous récupérés en pied de colonne sous forme d'une dispersion dans une solution aqueuse du co-solvant polaire utilisé;

- on répète plusieurs fois le fractionnement du raffinat obtenu à l'étape précédente sur le même type d'équipement mais en accroissant à chaque fois la polarité du fluide solvant en faisant varier sa pression, sa température et teneur en co-solvant, de façon à séparer successivement chacune des familles de phospholipides et de leurs dérivés, parmi lesquels on peut citer : phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-choline, phospholipides acides.

L'invention se rapporte donc aussi à un procédé de purification des lipides polaires à partir d'une matière naturelle ou synthétique constituée principalement d'un mélange de lipides, caractérisée en ce que l'on fractionne ladite matière par un procédé décrit précédemment.

5

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent donnés à titre illustratif et dans lesquels il sera fait références aux dessins en annexe dans lesquels :

- la figure 1 représente un contacteur pour la mise en œuvre du procédé de fractionnement selon l'invention.

10

- la figure 2 représente une colonne pour la mise en œuvre du procédé de fractionnement selon l'invention.

Exemple 1 : Matériels.

15

1) Huiles.

Les mélanges de lipides utilisés sont des huiles extraites du gluten de blé par les méthodes conventionnelles, dont les compositions massiques obtenues par chromatographie en phase liquide, sont les suivantes :

20

HUILE 1

Triglycérides : 38 %

Stérols : 4 %

Sphingolipides : 8,5 %

Monogalactosyldiglycérides (MGDG) : 10,2 %

25

Digalactosyldiglycérides (DGDG) : 25,5 %

Phospholipides : 13,8 %

Dont : Phosphatidyl-éthanolamine : 5,1 %

Phosphatidyl-choline : 5,4 %

HUILE 2

30

Lipides neutres : 49 %

Sphingolipides : 9 %

MGDG : 12 %

DGDG : 30 %

35

L'huile est mise en émulsion dans un mélange d'eau et d'éthanol par agitation mécanique, avec une composition massique de : 84 % d'eau, 10 % d'huile et 6 % d'éthanol.

2) Équipement.

Deux appareils ont été utilisés : un contacteur fonctionnant en mode discontinu et une colonne fonctionnant en mode continu. L'équipement présenté sur la figure 1 est constitué principalement en un contacteur (1) cylindrique d'un volume de 0,5 litre rempli d'éléments de garnissage (2) de type Intalox de 10 mm de dimension nominale, qui peut être balayé par un solvant à pression supercritique dans une gamme de températures comprises entre 20 et 80°C et jusqu'à une pression de 30 Mpa. Le solvant est ensuite détendu dans une vanne (3) et l'extrait séparé dans des séparateurs (4, 5, 6) tels que ceux décrits dans le brevet français No. 2 584 618.

L'équipement représenté sur la figure 2 est constitué principalement d'une colonne de fractionnement (1) d'un diamètre de 58 mm et d'une hauteur de 4 m remplie d'un garnissage de type Intalox de 10 mm en acier inoxydable, dotée d'une double-enveloppe divisée en quatre tronçons superposés permettant la circulation de fluides caloporteurs à des températures différentes afin de réaliser un gradient de température qui va induire un reflux interne d'extrait, comme il est connu dans l'art antérieur. Le fluide solvant est constitué de dioxyde de carbone qui est comprimé à l'état liquide par une pompe (2) volumétrique à membrane à débit réglable entre 10 et 60 kg/h auquel on peut ajouter un co-solvant liquide, par exemple constitué de butane approvisionné dans un réservoir du commerce, grâce à une autre pompe (3) de même type dont le débit peut être ajusté entre 2 et 10 kg/h. Le solvant ainsi comprimé à la pression souhaitée est réchauffé dans un échangeur de chaleur (4) constitué d'un double tube dont le tube extérieur est balayé par de l'eau chaude à température adéquate. La charge à traiter, préalablement portée à une température suffisante pour permettre son pompage, est injectée entre deux étages de la colonne via une pompe (5) volumétrique à membrane dont le débit peut être réglé entre 2 et 10 kg/h. Il est également possible d'injecter directement le co-solvant liquide dans la colonne, favorablement entre le premier et le second étage. Le raffinat sort en pied de colonne, et est décomprimé jusqu'à la pression atmosphérique via un

système de sas constitué de deux récipients (6, 7) successifs au sein desquels a lieu la détente à des pressions inférieures à celle régnant dans la colonne (1), permettant le dégazage du liquide et le recyclage partiel du solvant vaporisé depuis le récipient (6). Le solvant chargé en extrait sort en tête de colonne, et est décomprimé via une vanne (8) de type déverseur, la baisse de pression entraînant la démixtion du mélange qui est admis dans un ensemble de séparateurs (9, 10, 11) constitués, selon le système décrit dans le brevet français FR 2 584 618, déjà cité, de chambres cycloniques permettant la séparation totale de la phase liquide et de la phase gazeuse avec apport de chaleur via les parois des séparateurs dont la double-enveloppe est parcourue par de l'eau chaude, ce qui permet d'apporter l'enthalpie requise pour assurer la vaporisation du solvant ; la phase liquide est soutirée à pression atmosphérique via un système de sas (12, 13, 14) fonctionnant selon le système décrit dans le brevet français FR 2 584 618, déjà cité. Le solvant ainsi débarrassé de l'extrait et d'une partie du co-solvant est liquéfié dans un condenseur (15) double-tube dont le tube extérieur est parcouru par un mélange eau-éthylène glycol refroidi vers 0°C, et stocké à l'état liquide vers 5°C dans un réservoir (16) dont le niveau est maintenu stable par appoint de dioxyde de carbone depuis une citerne extérieure.

3) Analyse CLHP des lipides polaires.

- Phase stationnaire silice non greffée, Nucleosil 100-5, 2 cartouches de 125x2 mm couplées, précédées d'une précolonne remplie avec le même support (8x3mm) (Macherey-Nagel, Hoechst, Düren, Allemagne).
- Four à colonne, température de 30°C.
- Pompe à gradient quaternaire P1000XR, avec dégazeur à membrane sous pression partielle (Thermo Separation Products, San Jose, Californie, USA).
- Autoinjecteur Kontron autosampler 360 équipé d'un boucle d'injection de 5µl (Kontron Instruments, Milan, Italie).

- Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière Cunow DDL 11 (Eurosep, Cergy, France), température du tube évaporateur de 35°C et pression d'azote de 1 bar.

Après évaporation des solvants et dilution dans un mélange chloroforme/méthanol, 1/1 v/v, les extraits sont analysés avec le gradient suivant, à un débit de 0,4 ml/min. comme indiqué dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Temps (min)	Chloro- forme	Chloroforme/ Méthanol 60/40	Chloroforme /Méthanol/Eau 60/34/6
0	100	0	0
1	100	0	0
11	0	100	0
27	0	0	100
31	0	0	100
32	0	100	0
35	0	100	0
36	100	0	0
50	100	0	0

10

Exemples 2 : Traitement de l'huile sur un contacteur en mode discontinu.

1) Extraction des lipides neutres de l'huile 1.

L'huile 1 est dispersée sous forme d'émulsion dans un mélange eau/éthanol avec les proportions eau/huile/éthanol 84/10/6.

50g de cette émulsion sont introduits dans le contacteur.

20 L'extraction est conduite avec un solvant constitué de dioxyde de carbone additionné de 10 % d'heptane, à une pression de 250 bar et une température de 60°C.

25 Les séparateurs sont maintenus à une pression de 50 bar et une température de 50°C.

Le débit de solvant est de 2 kg/h. Après une durée d'extraction de deux heures, un extrait dans l'heptane est récupéré. Après évaporation du solvant, 2 g de lipides neutres sont récupérés:

Le contacteur contient alors un système dispersé de lipides polaires contenant 2,9 g de lipides polaires avec la composition lipidique suivante :

- Sphingolipides : 14,5 % dont 2 % de céramides
5 et 12,5% de glycosphingolipides)

- MGDG : 18,5 %
- DGDG : 45 %
- Phospholipides : 22 %

Cette suspension stable est parfaitement soutirable en l'état du contacteur. Des extractions 10 successives peuvent être effectués directement sur cette émulsion de lipides polaires sans reprise de la charge.

2) Extraction des lipides neutres de l'huile 2.

L'huile 2 est dispersée sous forme d'émulsion dans un mélange eau/éthanol avec les proportions eau/huile/éthanol 84/10/6.

50g de cette émulsion sont introduits dans le contacteur.

20 L'extraction est conduite avec un solvant constitué de dioxyde de carbone additionné de 10% d'heptane, à une pression de 250 bar et une température de 60°C.

Les séparateurs sont maintenus à une pression de 50 bar et une température de 50°C.

25 Le débit de solvant est de 2 kg/h. Après une durée d'extraction de deux heures, un extrait dans l'heptane est récupéré. Après évaporation du solvant, 2,3 g de lipides neutres sont récupérés

30 Le contacteur contient alors un système dispersé de lipides polaires dans un mélange eau/éthanol contenant 2,5 g de lipides polaires avec la composition suivante :

- Sphingolipides : 17,5 % dont 2,5 % de céramides et 15 % de glycosphingolipides

- MGDG : 23,5 %
- DGDG : 59 %

35 Cette suspension stable est parfaitement soutirable en l'état du contacteur. Des extractions successives peuvent être effectués directement sur cette émulsion de lipides polaires sans reprise de la charge.

3) Obtention d'une coupe riche en sphingolipides et MGDG.

5 Successivement à la manipulation décrite ci-dessus en (1), la dispersion déshuilée est soumise à une extraction conduite avec du dioxyde de carbone additionné de 5 % d'éthanol, à une pression de 250 bar et une température de 60°C.

10 Les séparateurs sont maintenus à une pression de 50 bar et une température de 50°C.

15 Le débit de solvant est de 2 kg/h. Après une durée d'extraction de trois heures, un extrait dans l'éthanol est récupéré. Après évaporation du solvant, 0,6 g de lipides polaires sont récupérés avec la composition suivante :

Sphingolipides (céramides) : 12 %

Monogalactosyldiglycérides : 88 %

20 Le contacteur contient alors une suspension stable dans un mélange eau/éthanol contenant 2,2 g de lipides polaires avec la composition suivante :

Sphingolipides (glycosphingolipides) : 16 %

DGDG : 57 %

Phospholipides : 27%

25 4) Obtention d'une coupe riche en glycolipides.

La dispersion raffinat obtenue ci-dessus en (3) est soumise à une extraction conduite avec du dioxyde de carbone additionné de 12% d'éthanol, à une pression de 250 bar et une température de 60°C.

30 Les séparateurs sont maintenus à une pression de 50 bar et une température de 50°C.

35 Le débit de solvant est de 2 kg/h. Après une durée d'extraction de trois heures, un extrait dans l'éthanol est récupéré. Après évaporation du solvant, 1,6 g de lipides polaires sont récupérés avec la composition suivante :

Sphingolipides (glycosphingolipides) : 22 %

DGDG : 78 %

Le contacteur contient alors une système dispersé stable de lipides polaires dans un mélange eau/éthanol contenant 0,6 g de lipides polaires avec une teneur en phospholipides supérieure à 98%.

5

5) Obtention d'une coupe riche en DGDG.

Successivement à la manipulation décrite en (2) ci-dessus, la dispersion raffinat déshuilée est soumise à une extraction conduite avec du dioxyde de carbone additionné de 8% d'éthanol, à une pression de 250 bar et une température de 60°C.

10

Les séparateurs sont maintenus à une pression de 50 bar et une température de 50°C.

15

Le débit de solvant est de 2 kg/h. Après une durée d'extraction de trois heures, un extrait dans l'éthanol est récupéré. Après évaporation du solvant, 1g de lipides polaires sont récupérés avec la composition suivante

Sphingolipides : 43 %

Monogalactosyldiglycérides : 51 %

20

Le contacteur contient alors une dispersion de lipides polaires dans un mélange eau/éthanol contenant 1,5 g de lipides polaires avec une teneur en DGDG supérieure à 95 %.

25

Exemple 3 : Traitement de l'huile par étapes successives sur une seule colonne en mode continu.

30

L'huile, préalablement mise en émulsion comme il a été indiqué ci-dessus, est traitée en plusieurs étapes dans des conditions où la polarité du fluide solvant à pression supercritique est successivement augmentée, ainsi qu'il a été décrit ci-dessus.

1) Extraction des lipides neutres.

35

L'huile 1 est mise en émulsion dans un mélange eau/éthanol avec les proportions eau/huile/éthanol 84/10/6.

Cette émulsion est injectée dans la colonne entre le troisième étage et l'étage supérieur à un débit de

1,2 kg/h. Un arrosage est effectuée en tête de colonne à l'aide d'eau et à un débit de 1,5 kg/h.

L'extraction est conduite avec un solvant constitué de dioxyde de carbone additionné de 9,7 % d'éthanol à 200 bar et 60°C, injecté en pied de colonne à un débit de 28,4 kg/h.

Une période d'équilibre de deux heures est respectée.

En tête de colonne est récupéré un extrait lipidique d'une teneur en lipides neutres supérieure à 99 %.

Le raffinat est récupéré en pied de colonne sous forme d'une dispersion de lipides polaires dans un mélange eau/éthanol, avec la composition lipidique suivante :

- Absence de lipides neutres (triglycérides et stérols)

- Sphingolipides : 14,5 % dont 2 % de céramides, 12,5 % de glycosphingolipides

- MGDG : 18,5 %

- DGDG : 45 %

- Phospholipides : 22 %

2) Extraction des lipides neutres.

L'huile 1 est mise en émulsion dans un mélange eau/éthanol avec les proportions eau/huile/éthanol 84/10/6.

Cette émulsion est injectée en tête de colonne à un débit de 2 kg/h..

L'extraction est conduite à 200 bar et 60°C avec un solvant constitué de dioxyde de carbone injecté en pied de colonne à un débit de 23 kg/h et d'éthanol injecté entre le premier et le deuxième étage de la colonne à un débit de 2,4kg/h.

Une période d'équilibre de deux heures est respectée.

En tête de colonne est récupéré un extrait lipidique d'une teneur en lipides neutres supérieure à 99 % après évaporation du solvant.

Le raffinat est récupéré en pied de colonne sous forme d'un système dispersé, avec la composition lipidique suivante :

- Absence de lipides neutres (triglycérides et stérols)

- Sphingolipides : 14,5 % dont 2 % de céramides et 12,5% de glycosphingolipides

5

- MGDG : 1,5 %

- DGDG : 45 %

- Phospholipides : 22 %

10

3) Extraction des lipides neutres.

L'huile 2 est mise en émulsion dans un mélange eau/éthanol avec les proportions eau/huile/éthanol 84/10/6.

15

Cette émulsion est injectée en tête de colonne à un débit de 2 kg/h.

L'extraction est conduite à 200 bar et 60°C avec un solvant constitué de dioxyde de carbone injecté en pied de colonne à un débit de 25 kg/h et d'éthanol injecté entre le premier et le deuxième étage de la colonne à un débit de 2,1 kg/h.

20

Une période d'équilibre de deux heures est respectée.

En tête de colonne est récupéré un extrait lipidique d'une teneur en lipides neutres supérieure à 99 %.

25

Le raffinat est récupéré en pied de colonne sous forme d'un système dispersé de lipides polaires dans un mélange eau/éthanol, avec la composition lipidique suivante :

- Absence de lipides neutres (triglycérides et stérols)

30

- Sphingolipides : 17,5 % dont 2,5 % de céramides, 15% de glycosphingolipides

- MGDG : 23,5 %

- DGDG : 59 %

35

4) Obtention d'une coupe riche en sphingolipides et MGDG.

Le raffinat obtenu ci-dessus en (2) est injecté en tête de colonne à un débit de 1 kg/h.

L'extraction est conduite à 250 bar et 60°C avec un solvant constitué de dioxyde de carbone injecté en pied

de colonne à un débit de 20 kg/h et d'éthanol injecté entre le premier et le deuxième étage de la colonne à un débit de 3kg/h.

Après une période d'équilibre de deux heures, l'extrait récupéré en tête de colonne est enrichi en lipides polaires les moins polaires de la classe des sphingolipides et MGDG avec la composition lipidique suivante :

Sphingolipides (céramides) : 8 %

MGDG : 82 %

Glycosphingolipides : 6 %

DGDG : 4 %

En pied de colonne, le raffinat est récupéré sous forme d'une dispersion stable de lipides polaires considérablement enrichie en lipides les plus polaires de la classe des DGDG et phospholipides dans un mélange eau/éthanol, avec la composition lipidique suivante :

Glycosphingolipides : 13%

DGDG : 59 %

Phospholipides : 28 %

20

5) Obtention d'une coupe riche en glycolipides (DGDG).

La dispersion raffinat ci-dessus en (3) est injectée en tête de colonne à un débit de 1 kg/h.

L'extraction est conduite à 250 bar et 60°C avec un solvant constitué de dioxyde de carbone injecté en pied de colonne à un débit de 20 kg/h et d'éthanol injecté entre le premier et le deuxième étage de la colonne à un débit de 3 kg/h.

Après une période d'équilibre de deux heures, l'extrait récupéré en tête de colonne est enrichi en lipides polaires les moins polaires de la classe des sphingolipides et MGDG avec la composition lipidique suivante :

Sphingolipides : 40 %

MGDG : 54 %

DGDG : 6 %

En pied de colonne est récupérée une dispersion de lipides polaires dans un mélange eau/éthanol avec la composition lipidique suivante :

Glycosphingolipides : 4 %

DGDG : 96 %

REVENDICATIONS

5 1) Procédé de fractionnement d'une matière première naturelle ou synthétique composée de plusieurs constituants et contenant au moins un composant à caractère amphiphile, caractérisé en ce que ledit fractionnement est réalisée à l'aide d'un solvant à pression supercritique à partir d'une dispersion de ladite matière première au sein d'un liquide insoluble ou très faiblement soluble dans le solvant à pression supercritique.

10 10 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que :

15 15 a) on prépare une dispersion à base de ladite matière première au sein d'un liquide insoluble ou très faiblement soluble dans le solvant à pression supercritique.

20 20 b) on soumet ladite dispersion à une extraction à l'aide d'un solvant à pression supercritique,

25 25 c) on recueille après ladite extraction deux fractions dont l'une est enrichie en l'un au moins d'un des constituants de la matière première,

30 30 d) éventuellement, on répète l'extraction sur l'une au moins des fractions recueillies à l'extraction précédente un nombre de fois suffisant pour obtenir l'un des constituants de la matière première sensiblement purifié dans une fraction.

35 35 3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'après chaque extraction on recueille un raffinat et un extrait et en ce que l'on soumet le raffinat à une nouvelle extraction.

4) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la matière première naturelle ou synthétique composée de plusieurs constituants et contenant au moins un composant à caractère amphiphile est constituée principalement d'un mélange de lipides comme une huile extraite de céréale par exemple de

blé, de gluten de blé, d'orge, d'avoine, de millet, de riz, etc....

5 5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le fractionnement est réalisé en fonction de la polarité des constituants.

10 6) Procédé selon l'une des revendications 4 ou 5, caractérisé en ce que l'on recueille après une ou plusieurs extractions un raffinat enrichi en lipides polaires appartenant à l'une au moins des classes suivantes : les sphingolipides, dont les céramides et les cérébrosides, les glycolipides, dont les monogalactosyldiglycérides et les digalactosyldiglycérides, 15 les phospholipides et parmi ceux-ci notamment les phosphatidyl-cholines, les phosphatidyl-éthanolamines, les phospholipides acides, et leurs dérivés.

20 7) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la dispersion est réalisée dans de l'eau ou dans une solution aqueuse de solvants organiques solubles dans l'eau, tels les alcools et de préférence l'éthanol, les cétones et de préférence l'acétone, les esters et de préférence l'acétate 25 d'éthyle.

30 8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que pour l'une au moins des extractions, on utilise comme solvant à pression supercritique, le dioxyde de carbone pur ou en mélange avec différents co-solvants choisis parmi les hydrocarbures légers comprenant entre 2 et 8 atomes de carbone, les alcools et de préférence l'éthanol, les cétones et de préférence l'acétone, les esters et de préférence 35 l'acétate d'éthyle, les hydrocarbures halogénés et de préférence les hydrocarbures fluorés.

9) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 8, caractérisé en ce que pour l'une au

moins des extractions, on utilise comme solvant à pression critique du dioxyde de carbone pur ou en mélange avec un ou plusieurs des co-solvants, à une pression comprise entre 7,4 et 50 MPa et de préférence entre 10 et 40 MPa et à une température comprise entre 0 et 80°C.

5

10

10) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, caractérisé en ce que pour l'une au moins des extractions, on utilise comme solvant à pression supercritique un hydrocarbure ayant entre 2 et 5 atomes de carbone, et de préférence 3 ou 4 atomes de carbone.

15

20

11) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 10, caractérisé en ce que pour l'une au moins des extractions, on utilise comme solvant à pression supercritique un hydrocarbure ayant entre 2 et 5 atomes de carbone, et de préférence 3 ou 4 atomes de carbone, à une pression comprise entre 4,2 et 20 MPa, et plus favorablement entre 5 et 15 MPa et à une température comprise entre 0 et 80°C.

25

30

12) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre en utilisant un système de fractionnement en discontinu par charges successives ou en continu sur colonne et dans ce dernier cas avantageusement sur une colonne fonctionnant à contre-courant.

35

13) Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 12, caractérisé en ce que l'on réalise plusieurs extractions successives sur une colonne fonctionnant en continu à contre-courant avec reflux d'extrait de façon à ce que la fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant est considérablement enrichie en lipides les moins polaires par rapport à la matière première de départ et en ce que la fraction recueillie en pied de colonne se présente sous la forme d'une dispersion dans un liquide qui est considérablement enrichie en lipides les plus polaires.

5 14) Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'on réalise plusieurs extractions successives sur une colonne fonctionnant en continu à contre-courant avec reflux d'extrait, avec un solvant à pression supercritique constitué de dioxyde de carbone en mélange avec de l'éthanol à une concentration comprise entre 1 et 5% masse, porté à une pression comprise entre 7,4 et 50 MPa, et de préférence entre 15 et 30 MPa, à une température comprise entre 32 et 80°C, de façon à ce que le fractionnement d'une charge ne contenant plus de lipides neutres conduise à une fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, qui est très enrichie en sphingolipides, dont les céramides et les cérébroside, par rapport à la charge.

10 15) Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'on réalise plusieurs extractions successives sur une colonne fonctionnant en continu à contre-courant avec reflux d'extrait, avec un solvant à pression supercritique constitué de dioxyde de carbone en mélange avec de l'éthanol à une concentration comprise entre 3 et 8% masse, à une pression comprise entre 7,4 et 50 MPa, et de préférence entre 12 et 30 MPa, à une température comprise entre 32 et 80°C, de façon à ce que le fractionnement conduise à une fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, qui est très enrichie en digalactosyldiglycérides par rapport à la charge.

15 16) Procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 12, caractérisé en ce que l'on réalise plusieurs extractions successives en discontinu dans un contacteur constitué d'un récipient sous pression éventuellement doté d'un garnissage destiné à améliorer la qualité du contact entre les deux phases du mélange à fractionner mis initialement en dispersion, avec un solvant à pression supercritique dont le pouvoir solvant va être modifié en plusieurs étapes successives de manière à

extraire successivement les différentes familles de lipides par ordre croissant de polarité.

17) Procédé selon l'une des revendications 4 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- on prépare une dispersion à base du mélange de lipide à fractionner dans de l'eau;

- on traite l'émulsion sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, opérée avec du dioxyde de carbone pur ou additionné d'un co-solvant non polaire à pression supercritique dans des conditions de pression et de température telles que la fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, appelée généralement extrait, est considérablement enrichie en lipides neutres, tels les triglycérides et les stérols, et appauvrie en composés polaires qui sont quasiment en totalité récupérés en pied de colonne dans la fraction appelée raffinat se présentant comme une émulsion dans l'eau;

- le raffinat est fractionné sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, opérée avec du dioxyde de carbone, additionné d'un co-solvant polaire, à pression supercritique comme solvant dans des conditions de pression et de température telles que la fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, est considérablement enrichie en composés les moins polaires, tels les sphingolipides, dont les céramides, et les monogalactosyldiglycérides (MGDG), et appauvrie en composés les plus polaires, tels les glycosphingolipides et

les digalactosyldiglycérides (DGDG) et les phospholipides, qui sont tous récupérés en pied de colonne sous forme d'une émulsion dans une solution aqueuse du co-solvant polaire utilisé;

- le raffinat, obtenu lors de l'étape précédente, est fractionné sur une colonne fonctionnant à contre-courant avec reflux d'extrait, opérée avec du dioxyde de carbone, additionné d'un co-solvant polaire, choisi avantageusement identique à celui utilisé dans l'étape précédente, à pression supercritique comme solvant dans des

conditions de pression et de température telles que la fraction obtenue en tête de colonne après séparation du solvant, est considérablement enrichie en composés moyennement polaires, tels les digalactosyldiglycérides (DGDG), et appauvrie en composés les plus polaires, tels les phospholipides, qui sont tous récupérés en pied de colonne sous forme d'une émulsion dans une solution aqueuse du co-solvant polaire utilisé.

- on répète plusieurs fois le fractionnement du raffinat obtenu à l'étape précédente sur le même type d'équipement mais en accroissant à chaque fois la polarité du fluide solvant en faisant varier sa pression, sa température et teneur en co-solvant, de façon à séparer successivement chacune des familles de phospholipides et de leurs dérivés, parmi lesquels on peut citer : phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-choline, phospholipides acides.

18) Procédé de purification des lipide polaires à partir d'une matière naturelle ou synthétique constituée principalement d'un mélange de lipides, caractérisée en ce que l'on fractionne ladite matière par un procédé selon l'une quelconque des revendications 4 à 17.

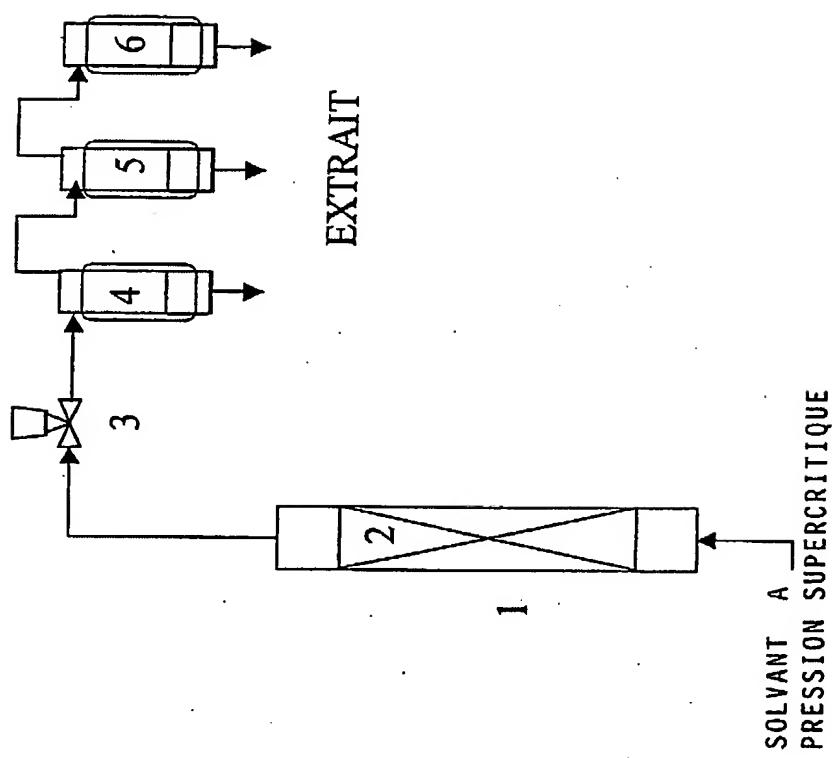


FIG. 1

2/2

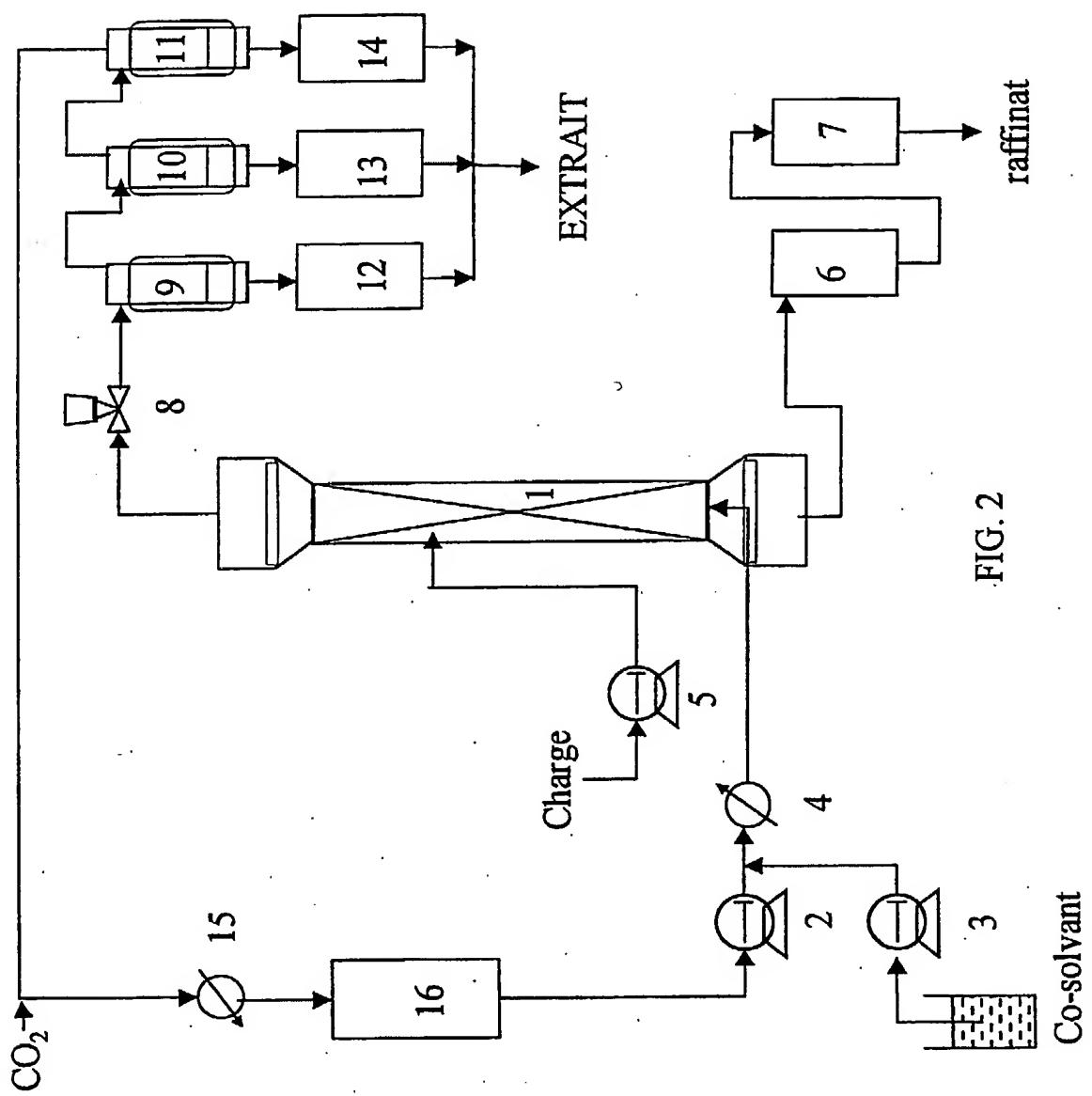


FIG. 2

Co-solvant

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No
PCT/FR 00/02931

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01D11/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 91 14377 A (PORTWALL PTY LTD) 3 October 1991 (1991-10-03) claims 1-13; figure 1 ---	1,2,4, 7-13,18
A	WO 83 03425 A (J.P.FRIEDRICH) 13 October 1983 (1983-10-13) claims 1-7 ---	1
A	US 5 759 549 A (R.V.K.HILTUNEN ET AL.) 2 June 1998 (1998-06-02) cited in the application the whole document ---	1 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

5 December 2000

Date of mailing of the International search report

12/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bertram, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr	1st Application No
PCT/FR 00/02931	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 724 087 A (M.PERRUT) 9 February 1988 (1988-02-09) claim 1 & FR 2 584 618 A 16 January 1987 (1987-01-16) cited in the application -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte	nal Application No
PCT/FR 00/02931	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9114377	A 03-10-1991	AU 2040495 A		10-08-1995
		AU 7468191 A		21-10-1991
		AU 7547691 A		21-10-1991
		WO 9114373 A		03-10-1991
		CS 9100764 A		12-11-1991
		CS 9101593 A		12-11-1991
		AU 7468291 A		11-06-1992
		WO 9208363 A		29-05-1992
		CS 9100810 A		17-06-1992
		NZ 237639 A		27-04-1995
		ZA 9102129 A		25-03-1992
WO 8303425	A 13-10-1983	US 4466923 A		21-08-1984
		AU 1510583 A		24-10-1983
		CA 1211124 A		09-09-1986
		EP 0105335 A		18-04-1984
		IN 159020 A		07-03-1987
US 5759549	A 02-06-1998	AT 171384 T		15-10-1998
		AU 3930395 A		19-06-1996
		DE 69505008 D		29-10-1998
		DE 69505008 T		20-05-1999
		EP 0793523 A		10-09-1997
		FI 972161 A		23-07-1997
		WO 9616712 A		06-06-1996
US 4724087	A 09-02-1988	FR 2584618 A		16-01-1987
		AT 49129 T		15-01-1990
		DE 3667920 D		08-02-1990
		EP 0212999 A		04-03-1987
		JP 1624487 C		18-11-1991
		JP 2051641 B		08-11-1990
		JP 62065703 A		25-03-1987
		NO 862766 A, B,		12-01-1987

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 00/02931

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 B01D11/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 B01D

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 91 14377 A (PORTWALL PTY LTD) 3 octobre 1991 (1991-10-03) revendications 1-13; figure 1 ---	1, 2, 4, 7-13, 18
A	WO 83 03425 A (J.P.FRIEDRICH) 13 octobre 1983 (1983-10-13) revendications 1-7 ---	1
A	US 5 759 549 A (R.V.K.HILTUNEN ET AL.) 2 juin 1998 (1998-06-02) cité dans la demande le document en entier ---	1 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bertram, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem/ Internationale No
PCT/FR 00/02931

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 4 724 087 A (M. PERRUT) 9 février 1988 (1988-02-09) revendication 1 & FR 2 584 618 A 16 janvier 1987 (1987-01-16) cité dans la demande	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux noms de familles de brevets

Document brevet cité
au rapport de recherche

Demande Internationale No

PCT/FR 00/02931

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9114377 A	03-10-1991	AU 2040495 A AU 7468191 A AU 7547691 A WO 9114373 A CS 9100764 A CS 9101593 A AU 7468291 A WO 9208363 A CS 9100810 A NZ 237639 A ZA 9102129 A	10-08-1995 21-10-1991 21-10-1991 03-10-1991 12-11-1991 12-11-1991 11-06-1992 29-05-1992 17-06-1992 27-04-1995 25-03-1992
WO 8303425 A	13-10-1983	US 4466923 A AU 1510583 A CA 1211124 A EP 0105335 A IN 159020 A	21-08-1984 24-10-1983 09-09-1986 18-04-1984 07-03-1987
US 5759549 A	02-06-1998	AT 171384 T AU 3930395 A DE 69505008 D DE 69505008 T EP 0793523 A FI 972161 A WO 9616712 A	15-10-1998 19-06-1996 29-10-1998 20-05-1999 10-09-1997 23-07-1997 06-06-1996
US 4724087 A	09-02-1988	FR 2584618 A AT 49129 T DE 3667920 D EP 0212999 A JP 1624487 C JP 2051641 B JP 62065703 A NO 862766 A, B,	16-01-1987 15-01-1990 08-02-1990 04-03-1987 18-11-1991 08-11-1990 25-03-1987 12-01-1987